

## Máster oficial en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria

TRABAJO FIN DE MÁSTER CURSO ACADÉMICO 2010-2011

Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria (Universidad de Almería)

# OBTENCION DE NUEVOS FARMACOS ANTITUMORALES A PARTIR DE ORGANISMOS MARINOS

**Autor:** Rafael Herena García.

**Lugar de Prácticas:** Departamentos de Colección y Microbiología I+D de PharmaMar S.A. (Colmenar Viejo, Madrid).

**Tutor Empresa:** Fernando de la Calle Verdú

**Tutor UAL:** Francisco García Camacho

**Duración:** 01 de Junio a 31 de Agosto.

## RESUMEN

El estudio presentado se basa en las Prácticas de Empresa realizadas en los departamentos de Colección y Microbiología de PharmaMar, empresa española dedicada a la investigación, desarrollo y comercialización de nuevos fármacos en oncología obtenido de organismos marinos.

En el Dpto. de Colección se realizaron extracciones de macroorganismos marinos congelados para la valoración de la actividad antitumoral con el fin de seleccionar muestras y elucidar las estructuras de nuevos antitumorales.

En el Dpto. Microbiología se realizaron extracciones de caldos de fermentación de microorganismos marinos y se procedió al análisis “*in silico*” para buscar correlaciones entre taxonomía bacteriana y diversidad química mediante el empleo de la base de datos Antibase

2010.

**INDICE:**

- 1. INTRODUCCION. (PAG. 3-8)**
- 2. MATERIAL Y MÉTODOS. (PAG. 8-19)**
  - a. DEPARTAMENTO DE COLECCIÓN (PAG.9-10)**
  - b. DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA (PAG. 11-18)**
    - 2.2.1 PROCESAMIENTO DE MICROORGANISMOS PARA EL  
DESCUBRIMIENTO DE NUEVAS MOLECULAS  
ANTITUMORALES (PAG. 13-15)**
    - 2.2.2 ESTUDIO SOBRE LA POSIBLE RELACION ENTRE  
ESPECIES DE ACTINOBACTERIAS MARINAS Y FAMILIAS DE  
COMPUESTOS (PAG. 15-18)**
- 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN (PAG. 19-26)**
  - 3.1 COLECCIÓN (PAG. 19)**
  - 3.2 MICROBIOLOGÍA (PAG. 20-26)**
    - 3.2.1 ESTUDIO SOBRE LA POSIBLE RELACION ENTRE ESPECIES  
DE ACTINOBACTERIAS MARINAS Y FAMILIAS DE COMPUESTOS (PAG.  
21-26)**
- 4. CONCLUSIÓN (PAG. 27)**
- 5. BIBLIOGRAFÍA (PAG. 28)**

## 1. INTRODUCCIÓN

### **PharmaMar**

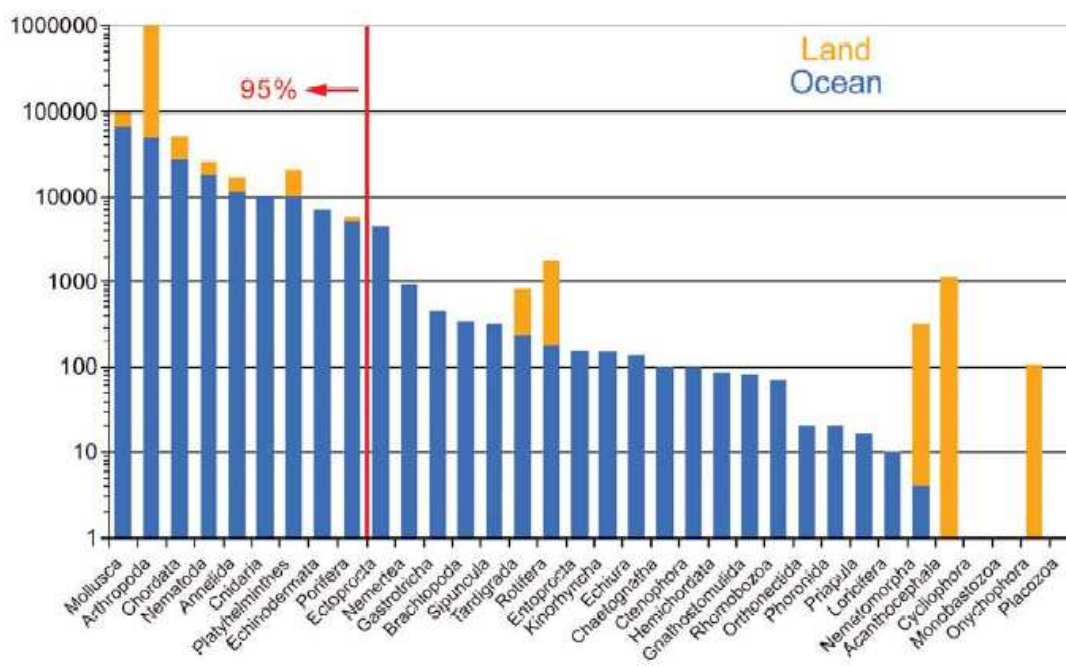
El carácter innovador y biotecnológico de PharmaMar me motivó a realizar mis prácticas en dicha empresa, ya que es la única compañía europea que ha establecido un programa específico de descubrimiento y desarrollo de fármacos basado en agentes de origen marino. La naturaleza ha dotado a ciertas moléculas marinas con estructuras y mecanismos de acción biológica sumamente originales, que los hacen muy interesantes como modelos para la búsqueda de nuevos fármacos. La empresa dispone de instalaciones y material que me ha permitido poner en práctica técnicas de las que tan solo tenía noción teórica, por lo que tuve el convencimiento de que ésta sería una gran oportunidad para aplicar buena parte de los conocimientos adquiridos en el máster de Biotecnología industrial y Agroalimentaria del que había tomado parte.

En las instalaciones de Colmenar Viejo (Madrid), se descubren nuevas moléculas con actividad antitumoral, se valoran *in vivo* e *in vitro*, y en caso de mostrar suficiente actividad y patentabilidad, se desarrollan en química médica para poder convertirse en medicamentos. Además, también se realiza la fabricación de Yondelis, primer medicamento europeo en entrar en oncología y 5 compuestos más que están siendo desarrollados en diferentes fases clínicas. En PharmaMar trabajan más de 300 empleados (200 en I+D), de los cuales un 46% son licenciados, y un 23% doctores.

El éxito de este desarrollo estriba en la apuesta que la empresa ha realizado en la exploración de la biodiversidad marina como fuente de nuevos fármacos.

## Biodiversidad Marina

Los océanos cubren el 71 % de la superficie de la Tierra, y representa el 95% de la biosfera. Fué en ellos donde se originó la vida hace más de 3.500 millones de años y hasta que se colonizó la tierra firme 3.000 millones de años después, ha estado desarrollando diversas estrategias evolutivas que han permitido disponer de la enorme biodiversidad entendida ésta como recursos genéticos marinos (RGM). La Fig. 1 compara a nivel de fila las biodiversidades animales marines y terrestre. Únicamente existen 2 fila exclusivos de ecosistemas terrestres. El 95% de las especies se localizan en 11 de los 36 fila. Ello es lógico atendiendo al millón de especies censadas de artrópodos debido a que hasta la fecha, las investigaciones de campo se realizaban en ecosistemas terrestres.



**Figura 1.-** Comparación por fila y número de especies censadas entre poblaciones de metazoa terrestres y marinas.

Muchas de las especies de invertebrados (y procordados) marinos como esponjas, corales y tunicados poseen actividad antitumoral. Estos organismos tienen en común su vida sésil, cuerpos blandos, inmóviles en muchos casos, con aspecto de plantas. Al no poseer defensas físicas, como conchas o espinas protectoras, y carecer de agilidad para la huida, estas especies presentan metabolitos de protección que pueden ser utilizados como fármacos debido a sus características de citotoxicidad o modulación de actividades biológicas. La fascinante variedad de los organismos marinos ofrece grandes oportunidades para la inspiración y el descubrimiento de nuevos fármacos, destacando compuestos con actividad antitumorales. La actual quimioterapia para tratamiento de cáncer está dominada por los productos naturales, según un estudio del científico David J. Newman, realizado entre 1981 y 2003, donde más del 60% de los fármacos utilizados con este fin son de origen natural. Lo que además resulta mas interesante si tenemos en cuenta que según la OMS el cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados.

La bioprospección marina es dependiente del avance de biotecnología e ingeniería marina y su aplicación mediante:

- ❑ Técnicas de exploración subacuática y buceo (submarinos y sistemas rebreather, por ejemplo)
- ❑ Desarrollo de herramientas moleculares para análisis de biodiversidad y exploración genómica de genes del metabolismo secundario (genómica, proteómica y metabolómica)
- ❑ Tecnología de optimización de elucidación estructural (RMN, HPLC/MS, etc).
- ❑ Aplicación industrial de Biotecnología Marina (Salud, ambiental, enzimas)

Esto hace que la exploración marina sea una actividad incipiente y que sólo conozcamos una mínima parte de su potencial. Gracias a la genómica también estamos empezando a entender el enorme potencial existente en los genomas marinos.

### Obtención de fármacos de origen marino

Existen actualmente más de 21.000 metabolitos con actividad biológica en la base de datos de MarinLit ([www.marinlit.com](http://www.marinlit.com)) que registra compuestos aislados de muestras marinas en publicaciones científicas.

Estas moléculas han sido obtenidas de diferentes hábitats marinos, destacando la novedad estructural encontrada en los fondos oceánicos. La siguiente tabla resume algunos compuestos bioactivos y sus aplicaciones encontrados en el fondo marino.

**Tabla 1.-** Especies y profundidades en las que habitan organismos productores de fármacos marinos. (F. de la Calle, 2007)

Compuesto	Aplicación	Fuente	Profundidad	Localización	Comentario
Isohomo Halicondrina B	Cáncer	Esponja <i>Lyssodendoryx</i>	> 100m	Nueva Zelanda	Véase 2.4
Discodermólido	Cáncer	Esponja <i>D. dissoluta</i>	140 m	Bahamas	Véase 2.4
Dictyostatina 1	Cáncer	Esponja no identificada Fam. <i>Corallistadae</i>	442 m	Jamaica	Toxicidad similar a taxol
Sarcodictina	Cáncer	Coral <i>Sarcodictyon roseum</i>	100 m	Mediterráneo	Toxicidad similar a taxol
Salinosporamida A	Cáncer	Bacteria <i>Salinospora tropica</i>	> 1.000 m	Pacífico norte	Véase 2.4
Topsentina	Antiinflamatorio Alzheimer	Esponja <i>Spongosporites ruetzeri</i>	300-600 m	Bahamas	Desarrollo pre-clínico iniciado
Gorgoninas	Implantes óseos	Corales, fam. <i>Isididae</i>	> 1.000 m	Pacífico norte	Bioingeniería

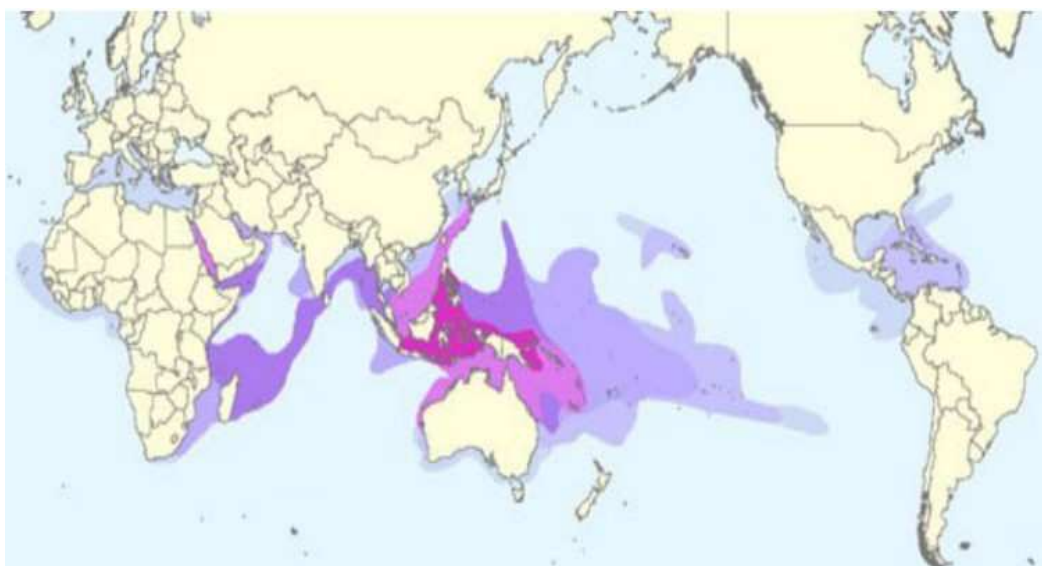
Es de destacar las altas profundidades a las que se han encontrado los organismos del cuadro anterior, por lo que se hace necesario técnicas especiales para grandes profundidades, que a su vez complementan al buceo clásico limitado a los primeros 50 metros de profundidad.

En cuanto al tipo de organismos más interesante, podemos diferenciar dos grandes tipos: macroorganismos y microorganismos. Entre los primeros destacan por su interés esponjas, corales, moluscos, ascidias y briozoos. Dentro de los microorganismos también existen grupos de mayor interés, particularmente hongos y actinobacterias. Uno de los inconvenientes del trabajo con macroorganismos se debe a la escasa cantidad de compuesto de interés encontrado, muchas veces en partes por millón (1mg de sustancia activa en 1 Kg de esponja), lo que implica el tener que recurrir a síntesis química para la obtención de mayor cantidad de compuesto. Precisamente la gran ventaja de algunos microorganismos es la de ser capaces de producir grandes cantidades de metabolitos de interés a nivel industrial mediante la fermentación de estos en reactores biológicos,

En PharmaMar la recolección de organismos marinos del medio natural, es realizada por el departamento de **Expediciones**. Este departamento está formado por científicos y buceadores profesionales encargados de, recoger las muestras de macroorganismos, y clasificación *in situ*. A las muestras de organismos se les asigna un primer número, a continuación complementa una ficha de información, a la que se adjunta una fotografía del organismo y se recogen datos sobre el punto exacto, la fecha, así como datos taxonómicos sobre el organismo.

Para obtención de microorganismos, los buzos se encargan de recoger muestras de sedimento y pequeños fragmentos de macroorganismos a distintas profundidades, las cuales se mandan en frío pero sin congelar a las instalaciones de PharmaMar en Colmenar Viejo (Madrid), donde serán procesados para obtener distintas cepas de microorganismos. Estas colonias serán caracterizadas molecularmente y atendiendo a su taxonomía serán estudiadas en cultivo líquido a diferentes escalas.

Las expediciones suelen ser realizadas en los puntos del planeta con una mayor biodiversidad, y a distintas profundidades (ver Figura 2). Cabe destacar la técnica usada en las inmersiones *rebreather*, que permite la extracción de muestras a una profundidad superior a los 50 metros. En cuanto a la repercusión en el medio, el impacto es mínimo, ya que solo se extraen muestra con interés analítico.



**Figura 2.-** Áreas de mayor biodiversidad marina según Census of Marine Life ([www.coml.org](http://www.coml.org))

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### Esquema general de actividades de I+D en PharmaMar

El Dpto. Colección se encarga de la extracción de las muestras marinas para su valoración en ensayos antitumorales (Macro-Organismos).

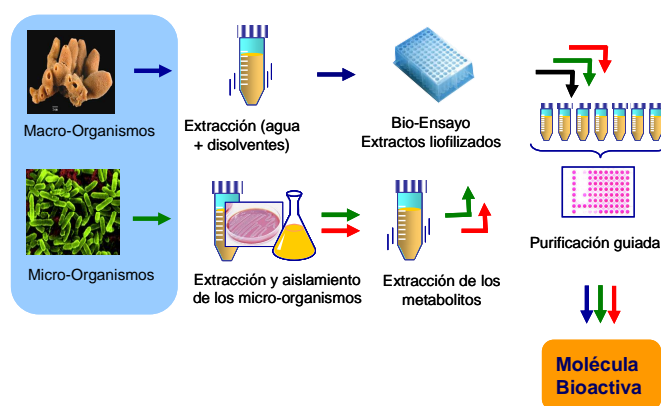
El Dpto. Microbiología realiza el aislamiento, caracterización y cultivo de



microorganismos asociados a las muestras marinas para su valoración antitumoral y el escalado de las que hayan dado actividad.

Durante mis prácticas he podido participar los procesos que llevan a cabo ambos departamentos, lo que me ha permitido conocer las técnicas y procedimientos específicos para la producción de extractos, con la intención de concretar la posible existencia de moléculas de interés farmacológico, en este caso más específicamente antitumorales.

Posteriormente se realizará el fraccionamiento químico mediante la purificación bioguiada (valoración de fracciones cromatográficas en screening) para la identificación de moléculas activas.



**Figura 3.-** Esquema de actividades de los Dptos. Colección y Microbiología.

#### a. **DEPARTAMENTO DE COLECCIÓN.**

El cometido del departamento de I+D **Colección**, es la clasificación y procesado de todas las muestras de macroorganismos, con el fin de valorar que muestras son activas, el mantenimiento de las mismas en sistemas de congelación. Material a partir del cual trabajan otros departamentos como el departamento de Química y Screening.

El primer paso cuando llegan muestras de macroorganismos a Colección, es el de asignarle a dicha muestra un numero ORMA (macroorganismos), el cual además tiene asignado un código de barras. Este número y código sirve para relacionar la

muestra del macroorganismo con una base de datos e incluirlo en el LIMS (Laboratory Information Management Systems), el programa que permite el acceso a dicha base de datos se llama Nautilus. Accediendo con el número ORMA están registrados todos los datos que previamente el departamento de Expedición recolectó *insitu*, y donde además se van añadiendo datos conforme se procesa y analiza la muestra. Una vez asignado el ORMA, se fotografían y recogen dos gramos para la extracción de posibles sustancias con actividad antitumoral, el resto se pesa y manda a las cámaras congeladoras de Colmenar y de Getafe, donde quedan almacenadas de forma indefinida hasta que en el caso de ser de interés, sean redirigidas a I+D.

Las extracciones en colección se realizan tanto en agua como en disolvente orgánico. Primero a los dos gramos introducidos en Falcons de 50 ml a los que se añade agua destilada, a continuación se tritura y se centrifuga, seguidamente se decanta y vierte la parte líquida en viales, en cuanto a la parte sólida es congelada. El extracto acuoso es “pipeteado” por un brazo robótico a pequeñas placas, las cuales posteriormente serán enviadas a Screening, donde se comprobará si tienen efecto antitumoral, ensayando en células tumorales humanas vivas.

En cuanto a la extracción en disolvente orgánico, comienza por liofilizar la parte sólida que quedó en el Falcon con agua, que será eliminada por dicha técnica.

A continuación le añadimos el disolvente orgánico, volvemos a homogeneizar, centrifugar y decantar, como en el caso anterior con el agua como disolvente, un robot se encarga de “pipetear” a placas de menor tamaño (gradillas 96 tubos de 1,2 ml) con el fin de suministrar a Screening para sus ensayos de actividad, el resto de extracto que queda en los viales es congelado para posibles replicas o re suministros. Cabe decir que suele haber mayor cantidad de resultados positivos en el disolvente orgánico que en agua.

**b. DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA.**

Este departamento es el encargado de aislar, identificar, clasificar, y cultivar microorganismos, pero también, procesar los extractos de estos, además de producir mediante fermentación, por lo que es uno de los departamentos más amplios en cuanto a sus funciones.

El primer paso se inicia con las muestras de sedimentos o trozos de macroorganismos recolectados por el departamento de Expedición. Se realiza la homogeneización y empleando diferentes medios de aislamiento en placas Petri, se aíslan la mayor cantidad posible de colonias que puedan resultar ser de diferentes microorganismos, para ello se utilizan distintos medios a distintas diluciones y diferentes antibióticos, en los que se cultivan muestras del sedimento u organismos los cuales han presentado actividad y es posible que el responsable de la biosíntesis del antitumoral pueda ser un microorganismo asociado, como se sospecha en muchos casos debido a las similitudes en la estructura química de algunos compuestos producidos por macroorganismos, con los sintetizados por microorganismos. Una vez que las colonias han sido aisladas unas de otras, el siguiente paso es la diferenciación de los cultivos para gestionar una colección de cepas únicas, para ello se realiza una Repetitive-PCR, técnica de fingerprinting. Por lo que se extrae DNA de cada cultivo y amplifica mediante rep-PCR. A continuación se realiza la taxonomía empleando otra PCR pero utilizando secuencias del gen ribosomal 16S rRNA y habiendo comprobado por electroforesis el resultado de la ampliación, el amplicón de rRNA del 16S es mandado a una empresa externa que se encargará de la secuenciación nucleótida, lo que permitirá mediante el cotejo con una base de datos mundial, la identificación taxonómica de dicha colonia, basando su análisis en el gen ribosómico del 16S.

Una vez identificada la especie a la que pertenece una colonia, esta será congelada por duplicado a -80° C y almacenada con el conjunto de “cepas”, para su posterior análisis o descartada en el caso de haber sido ya analizada y resultar carente de interés. Es obvio un mayor interés en el descubrimiento de organismos pertenecientes a especies que no existen en la colección de cepas o incluso desconocidas. Además de existir un mayor preferencia por unos grupos que por otros.

Los microorganismo de más interés actual es el gran grupo de las Actinobacterias, son bacterias Gram positivas, la mayoría de ellas se encuentran en sedimentos, e incluyen algunas de las más típicas formas de vida terrestre, jugando un importante rol en la descomposición de materia orgánica, Otras Actinobacterias habitan en las plantas y animales, incluyendo algunos patógenos, tales como las *Mycobacterium*. En 1940 Selman Waksman descubrió en el suelo las bacterias que producen actinomicina, un descubrimiento que le valió el premio Nobel. Se han descubierto desde entonces centenares de antibióticos naturales en estos microorganismos, especialmente en el género *Streptomyces*.

Representantes de este grupo son:

- [\*Actinomyces\*](#)
- [\*Arthrobacter\*](#)
- [\*Corynebacterium\*](#)
- [\*Frankia\*](#)
- [\*Micrococcus\*](#)
- [\*Micromonospora\*](#)
- [\*Mycobacterium\*](#)
- [\*Nocardia\*](#)
- [\*Propionibacterium\*](#)
- [\*Streptomyces\*](#)

### 2.2.1 PROCESAMIENTO DE MICROORGANISMOS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVAS MOLECULAS ANTITUMORALES

Para la el análisis de actividad es necesario el cultivo de las cepas mantenidas en crioviales a diferentes volúmenes:

- **Procesamiento para Screening primario.**

Comienza con en el cultivo de la cepa en placas de 12 pocillos con un volumen de 2 ml y en un medio estándar de crecimiento, para después pasarlos a diferentes medios de producción, ya que algunos son más favorable para diferentes tipos de microorganismos, al mismo tiempo se recogen muestras de cada uno de los medios y a distintos tiempos, con el fin de determinar el momento del ciclo vital del organismo en el que se da la mayor producción del posible antitumoral. A continuación se liofilizan, se les añade un disolvente orgánico, y finalmente son enviados a Screening.

- **Retest de actividad**

En el caso de resultar positivo el análisis realizado por Screening anteriormente, seguimos con este proceso en Erlenmeyer de 20 ml de volumen, en el que se los microorganismos se cultivan primero en el medio de crecimiento, para después pasar al medio de producción que en el paso anterior se observo una mayor síntesis de producto. Se extraen 5ml del cultivo, se liofiliza y añaden disolvente orgánico, para finalmente enviar 500 µl de nuevo a Screening que confirmará la actividad, y otro volumen similar a HPLC-Masas el cual determinará si es un producto desconocido para seguir con el proceso o si por lo contrario es un compuesto ya conocido y podemos descartar el seguir con el proceso.

- **Análisis en HPLC-Masas**

En el caso de confirmar la actividad antitumoral en el retests, se analizan los extractos mediante HPLC acoplado a masas para cotejar, pico a pico, la existencia de compuestos ya conocidos de las BBDD propias de Pharmamar. En el caso de no haber coincidencia, esa cepa será candidata al escalado a 6 litros debido a que para poder continuar con el proceso de análisis y poder elucidar la molécula, es necesario aumentar la cantidad de extracto, para lo que tenemos que aumentar la escala del cultivo a un mayor volumen.

- **Escalado a una fermentación de seis litros.**

El escalado comienza a partir de uno de los dos crioviales pertenecientes a la colección de cepas de microbiología, de la cual se cree pueda producir algún compuesto de interés. Primero hacemos un cultivo en placa de agar con el fin de confirmar la identidad de la especie a escalar, y descartar posibles contaminaciones por parte de otros organismos, en el supuesto de ser correcto se comienza el cultivo de 20ml en tres Erlenmeyer de 100 ml de capacidad, en este caso también sembramos un aplaca de agar representando a cada uno de los matraces. A partir de dos de los Erlenmeyer anteriores, cultivamos otros dos de cada en Erlenmeyer de 250ml (con 50ml de medio), y cultivamos tres Erlenmeyer de 250 ml con el restante, para conservar uno de ellos como control, y restaurar el criovial de partida, además realizamos otra placa para seguir controlando la contaminación. Para terminar con el escalado, con los seis matraces se realizan otros 24 cultivos de 250 ml en Erlenmeyer de 2 l de capacidad para obtener finalmente un volumen de 6 litros de cultivo. Los dejamos en agitación y a temperatura óptima.

- **Cosechado del caldo de cultivo**

Una vez ha crecido el cultivo comenzamos la cosecha, primero tomamos el Erlenmeyer control de 250 ml y otro cualquiera de los 24, realizamos otra siembra en placas de ambos, y observamos una muestra de cada al microscopio con el propósito de mantener el control sobre la contaminación de la misma, extraemos 10 ml de cada Erlenmeyer, lo centrifugamos, medimos el volumen celular y el pH, finalmente liofilizamos otros 5ml de cada en viales para antitumoral (Screening).

A continuación centrifugamos los 6 litros a 8.000 rpm durante 30 min de estas manera podemos separar el sobrenadante, de las células, ya que realizaremos análisis de ambos extractos, tanto el sobrenadante como las células son tratados con disolventes orgánicos, con el propósito de llevar a cabo la extracción de los compuestos, para el sobrenadante se decanta y desecha la fase acuosa, y en el caso de las células, una vez homogeneizada la mezcla con el disolvente, se filtra mediante una bomba de vacío y un filtro al cual añadiremos celite, cuyo objetivo es el de proteger el filtro para próximas separaciones y disminuir la colmatación del filtrado, luego reducimos el volumen de disolventes mediante un rotavapor, y recogemos dos viales de cada (uno para masa y otro para antitumoral), terminamos de evaporar el disolvente orgánico y congelaremos los extractos.

Si estos pasos previos son exitosos comenzarían las fases usualmente más largas en el desarrollo de fármacos, la fase pre clínica, donde se estudiarán los mecanismos de acción en organismos vivos, y los estudios clínicos, durante la cual el potencial fármaco es experimentado en seres humanos de características y circunstancias específicas. Para finalmente poder sacar el fármaco al mercado, suelen pasar alrededor de 12 años de media.

### **5.2.1 ESTUDIO SOBRE LA POSIBLE RELACION ENTRE ESPECIES DE ACTINOBACTERIAS MARINAS Y FAMILIAS DE COMPUESTOS.**

Uno de los cometidos más interesantes durante mis prácticas en PharmaMar, ha sido la colaboración a la hora de crear una base de datos para el departamento de Microbiología, la cual relacionara las especies de actinobacterias o grupos de especies emparentadas, con familias de compuestos de interés por su posible acción anticancerígena.

La finalidad de este trabajo es poder conocer qué tipo de moléculas bioactivas se han aislado de diferentes especies para poder hallar distancias filogenéticas que hayan conservado los genes necesarios para la biosíntesis.

Partiendo del dendograma de Actinobacterias SILVA, que basa la taxonomía de las especies mediante el cotejo de rRNA del 16S, comenzamos a redactar la base de datos en formato Excel, atribuyendo a cada una de las especies estudiadas, compuestos aislado en bibliografía y recopilados en la base de mundial Antibase 2010, mediante colores donde se especifican las características farmacológicas (antitumorales, antibióticos, antifúngicos y otros) de los compuestos, y se añaden hiperenlaces con la estructura química de cada compuesto, así como imágenes de las cepas cultivadas, con el fin de poder encontrar alguna relación entre las especies y estos últimos. Ya que de ser posible, esto permitirá un mayor avance en el descubrimiento de nuevos fármacos de origen microbiano, actualmente se podrá aumentar la velocidad a la hora de descartar o mostrar interés por dichos microorganismos. Incluso en un futuro mediante estudios genéticos más detallados, se podrá determinar los genes responsables en la biosíntesis



del compuesto, con la intención de mejorar la producción mediante técnicas biotecnológicas, como puede ser la ingeniería genética en microorganismos con DNA recombinante.

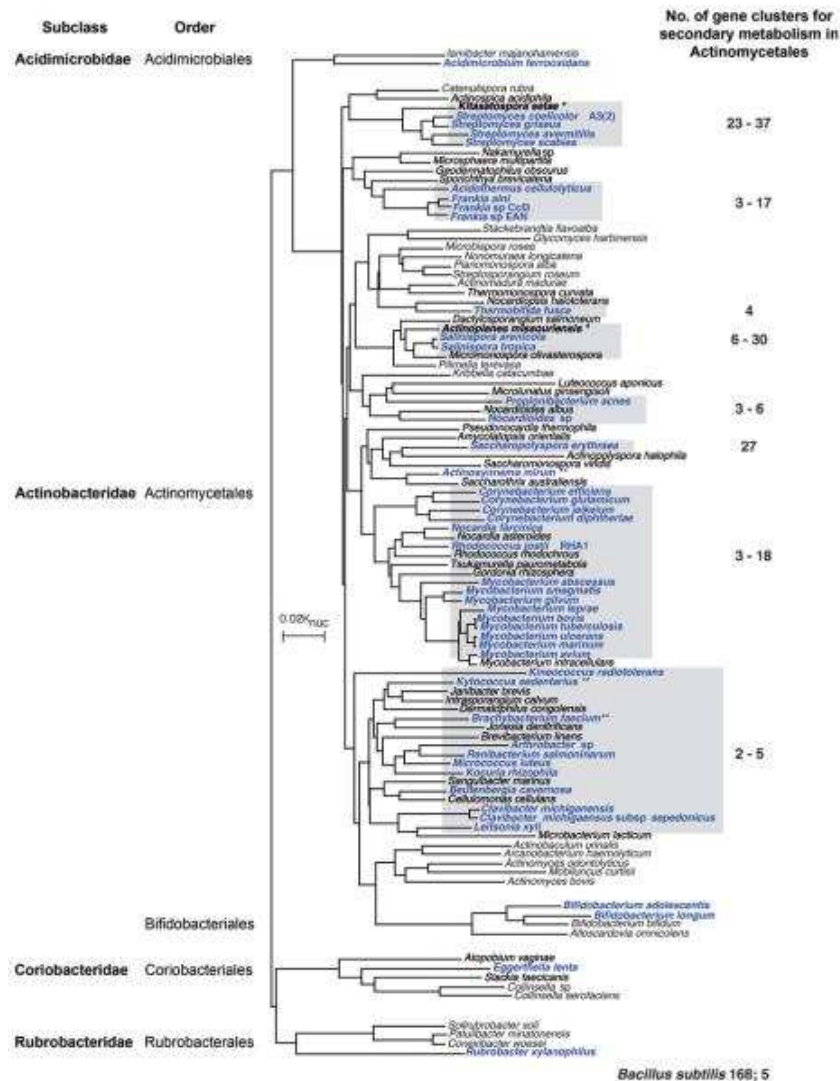


Figura 4.- Dendrograma de Actinobacteria

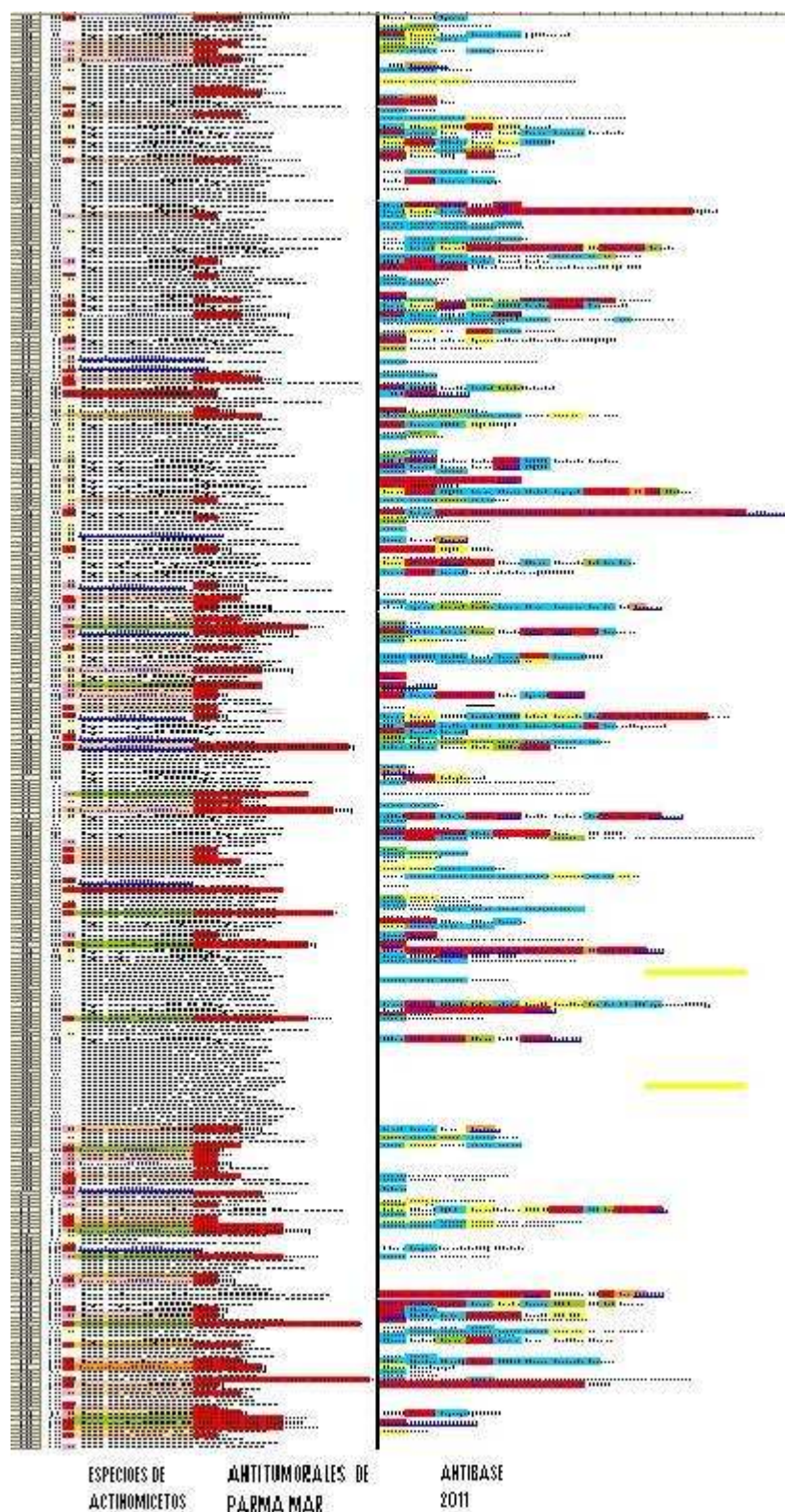
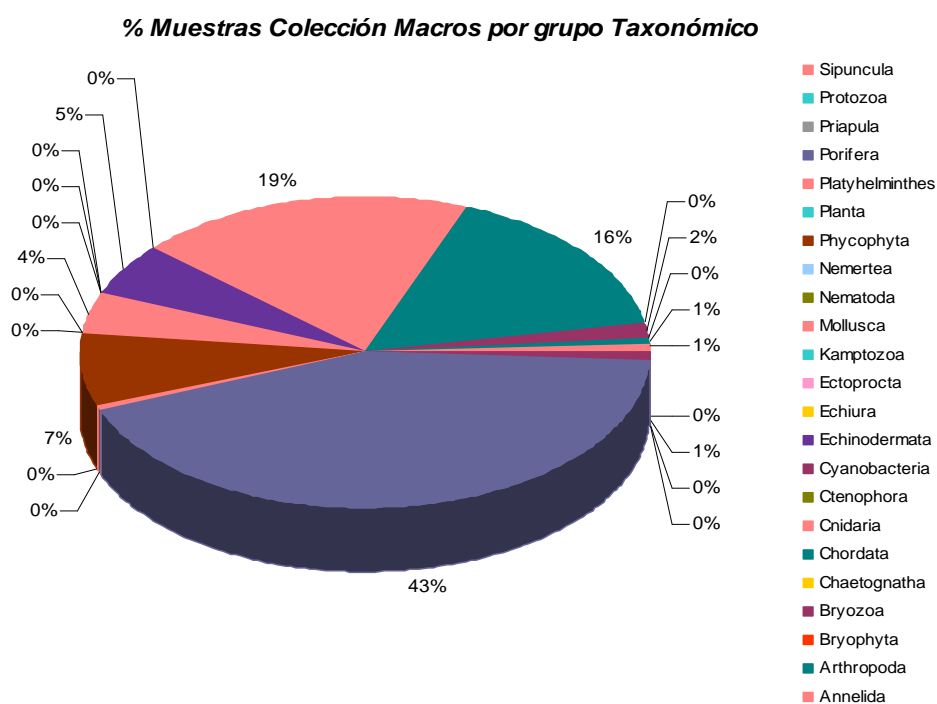


Figura. 5.- Base de datos de correlación entre actinomicetos y fármacos.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 COLECCIÓN

Durante mi estancia en el departamento de colección pude observar que existen algunas familias de organismos más interesantes desde el punto de vista farmacológico y para la producción de antitumorales.



**Figura 6.-** Porcentaje de muestras analizadas por grupo taxonómico.

La primera dificultad al intentar descubrir un macroorganismo productor de antitumorales puede ser la identificación taxonómica exacta del organismo de interés, ya que tanto ascidias como esponjas, son un grupo muy diversificado, con especies de morfología muy similar, e incluso con una gran cantidad de especies sin catalogar. Además se han dado ejemplos de organismos que siendo de la misma especie han resultado ser productores de una sustancia de interés, y otros congéneres no, esto puede ser debido a diversos factores ambientales o incluso a la existencia de un organismo asociado.

Otro problema más a la hora de descubrir anticancerígenos a partir de los macroorganismos marinos, es el solo disponer de una cantidad limitada de dicho organismo en el laboratorio, ya que pese a la mejora en las técnicas, que han permitido disminuir la cantidad requerida para el estudio de forma considerable, la adquisición de una mayor cantidad del organismo a estudiar, depende de su recolección en la biosfera, lo que puede hacer peligrar el desarrollo de un fármaco, debido a la posible dificultad de ser encontrado en el entorno, e incluso a la continua desaparición de biodiversidad.

Pese a todo como el pipeline de PharmaMar demuestra los macroorganismos son de gran interés para el descubrimiento de nuevos fármacos y antitumorales de origen marino.

### 3.2 MICROBIOLOGÍA

En Microbiología durante mis practicas le realizamos la extracción al escalado de tres cepas diferentes de bacterias procedentes de la colección de PharmaMar, dos de ellas procedían de Actinobacterias, más concretamente una de *Streptomyces*, que es el género de actinomicetos más extenso e interesante desde el punto de vista farmacológico, otra era una *Stappia* marina, y finalmente una *Amycolatopsis*. Durante el cosechado de seis litros, se tomaron medidas de pH las cuales oscilaron entre 6,5-7,5 dependiendo de crecimiento y consumo del sustrato, también se tomó medidas del crecimiento celular, que resultó entrar en el rango de 5% para la bacteria y del 10%-14% para los actinomicetos, por lo que pude observar una mayor productividad en el escalado de Actinobacterias, que junto a su capacidad de producir metabolitos de interés contribuye a hacerlas más atractivas para producción industrial.

Uno de los retos actuales de Microbiología es el conseguir aislar la mayor parte de la población bacteriana existente ya que por tecnología molecular sabemos que sólo es posible cultivar una ínfima parte de la biodiversidad real.

Por comparativas de aislados bacterianos con análisis de metagenomas por pirosecuenciación de la misma muestra, se comparan resultados y se observa que hay géneros de microorganismos que no son aislados y sí aparecen sus amplicones en el análisis de secuencias. Es decir, las colonias no llegan a desarrollarse, perdiendo de esta manera la oportunidad de su posterior estudio, esto ocurre con algunas especies de *Frankia* o *Actinomices*, que requerirán el desarrollo de medios más específicos para el crecimiento de colonias.

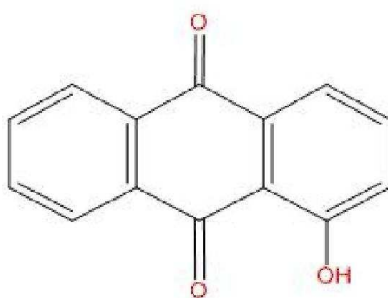
Otro problema es el hecho de que cepas con similar taxonomía (pertenecientes a la misma especie) no siempre son productoras de los mismos compuestos. Esto puede ser debido a varios factores como pueden ser, el error en cuanto a su clasificación taxonómica, a la mutación de una de las dos cepas mediante la cual los organismos adquieren la capacidad de biosíntesis, incluso las circunstancias en el que el microorganismo es cultivado, ya que ciertos metabolitos solo son producidos bajo unas determinadas condiciones de crecimiento o estrés ambiental.

### **3.2.1 ESTUDIO SOBRE LA POSIBLE RELACION ENTRE ESPECIES DE ACTINOBACTERIAS MARINAS Y FAMILIAS DE COMPUESTOS**

La principal problemática que nos encontramos en el departamento de Microbiología en cuanto a la biosíntesis de fármacos, es extrapolable a los datos encontrados en bibliografía y reflejados en las bases de datos de compuestos activos de microorganismos (Antibase 2010). Por ello se realizó el estudio de relacionar las sustancias de interés antitumoral con las especies de actinomicetos, ya que en ella podemos observar como especies muy separadas desde el punto de vista taxonómico, son capaces de biosintetizar metabolitos similares en cuanto a su estructura química y de cómo organismos muy emparentadas e incluso cepas la misma especie no coinciden o biosintetizan metabolitos de estructura muy dispares desde el punto de vista químico. Como ya he mencionado en el apartado anterior esto puede deberse a varias circunstancias.

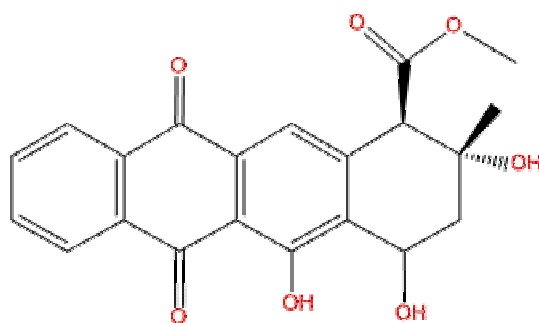
La primera es la determinación taxonómica, ya que esta es basada en el rRNA del gen ribosómico del 16S, lo que limitaría de forma inevitable su clasificación, pues puede darse el caso de organismos lo suficiente diferenciados genéticamente para ser considerados como especies independientes, que hayan conservado este gen con una secuencia similar. También debemos ser cautos con la identificación ya que la mayor parte de los autores lo realizan en el GenBank donde hay millones de secuencias “fantasmas” que pueden alterar la interpretación. Otro factor a tener en cuenta es la transferencia horizontal de DNA (TGH) que es un proceso en el que un organismo transfiere material genético a otra célula que no es descendiente, incluso con la mediación de virus puede darse este fenómeno, lo que provoca que secuencias de DNA e incluso genes sean transferidos entre especies poco emparentadas, intercambiando facultades a la hora de producir metabolitos de interés. Además no hay que olvidar que en el caso de organismos con una capacidad de proliferación tal como sucede con procariotas, las posibilidades de mutación son mucho más elevadas que en el caso de los macroorganismos.

Pese a toda la problemática anterior, si que se puede apreciar como existen compuestos y familias de compuestos, que parecen asociados a ciertas clases de actinomicetos como es el caso de *Streptomyces*, que además de ser el grupo de Actinobacterias más prolifero en cuanto a la producción de anticancerígenos, existen una gran cantidad de compuestos e incluso estructuras químicas asociadas a dichos microorganismo, como es el caso de los compuestos químicos cuya estructura básica es la siguiente:

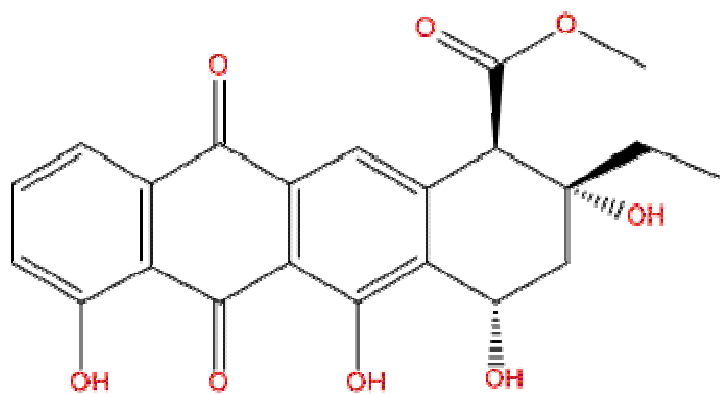




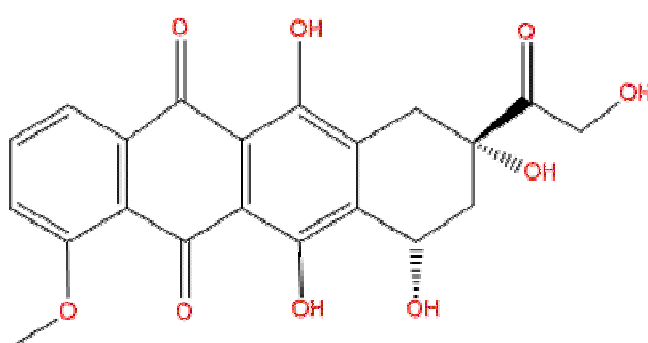
Ejemplos de otros compuestos biosintetizados por *Streptomyces* y que parten de la misma estructura química serían:



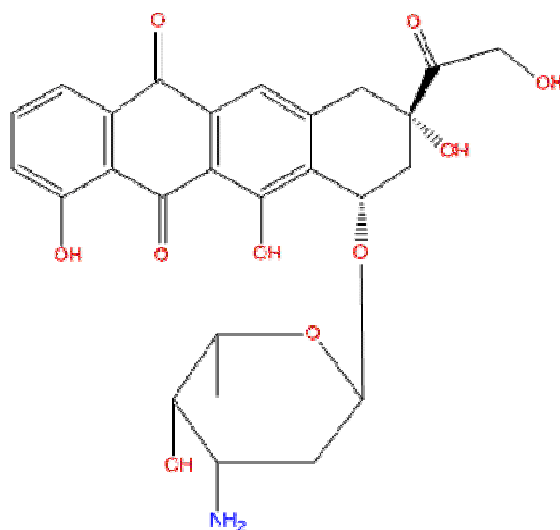
*4-Deoxyauramycinone*



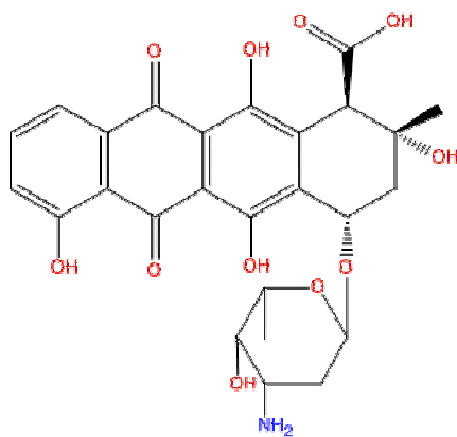
Aklavinone; MA-144-D1



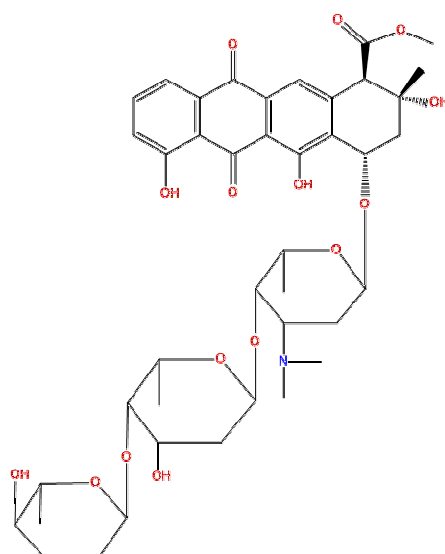
Adriamycinone



*4-O-Demethyl-11-deoxydoxorubicin; 11-Deoxy-14-hydroxycarminomycin; COMP W*

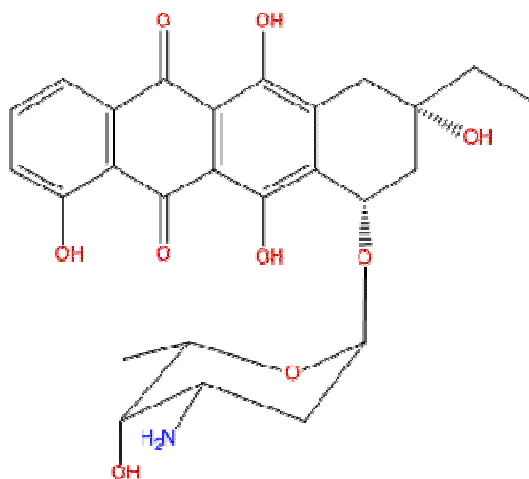


*Anthracycline 14-A12; D-788-10; 10-Carboxy-4-O-demethylfeudomycin-C*

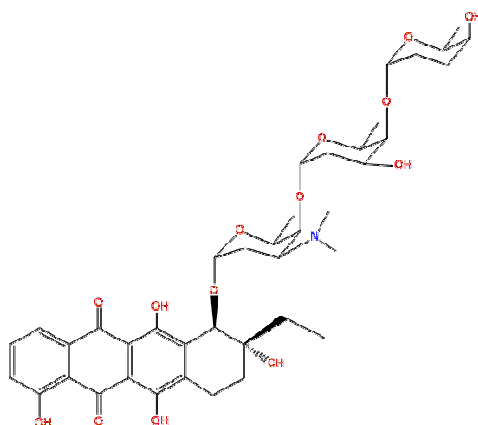


*Auramycin E*



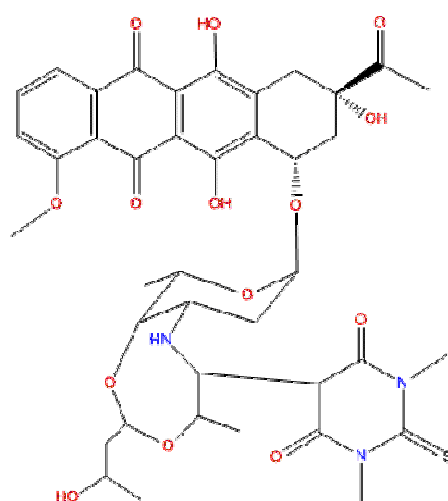


*13-Deoxocarminomycin; DOC; D-788-11*



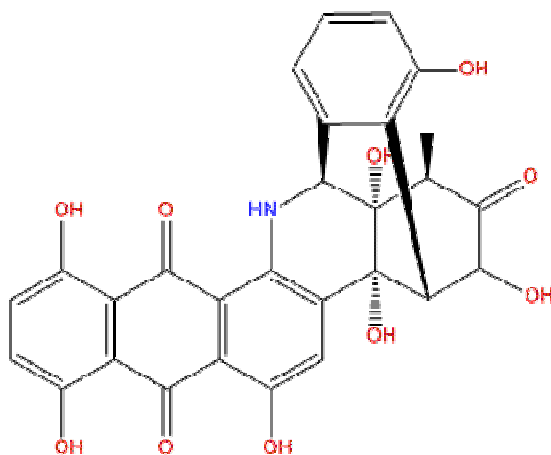
*Cosmomycin B; Rhodomycin Y; Rhodilunancin B; g-Rhodomycin RDRs; A-262-B; g-*

*Rhodomycin-Roa.Deofuc.Rod; Cytorhodin K*



*FCE 24366*

Como explicamos anteriormente, en ocasiones organismo muy separados desde el punto de vista taxonómico biosintetizan metabolitos de estructuras químicas muy parecidas, como es el caso de *Micromonospora chersina*, la cual biosintetiza Dynemicin, que parte de una estructura similar a las de los compuestos anteriores todos ellos biosintetizados por distintas especies de *Streptomyces*..



*Dynemicin P*

#### **4. CONCLUSIÓN.**

El avance de tecnologías moleculares ha revolucionado el clásico concepto de biodiversidad marina que entroncaban los organismos como “cajas cerradas” y ahora sabemos que además de existir una biodiversidad genética muy superior a la esperada, existen transferencias de genes involucrados en muchos casos, en la producción de metabolitos con actividad en medicina.

La evolución ha permitido diversas formas de vida, sobre todo marinas, que necesitan poseer un arsenal metabólico que les confieren ventajas evolutivas como evitar depredación, comunicación o defensas y esas moléculas podemos convertirlas en medicinas.

Es por esto que los avances en farmacología deben estar inspirados en soluciones de la naturaleza, y adaptarlas si es necesario mediante mejoras biotecnológicas a nuestras necesidades más concretas.

En mi opinión la gran labor de empresas que utilizan las sustancias naturales como fuente de inspiración para el desarrollo de fármacos, es el de elucidar y salvaguardar la mayor cantidad posible de moléculas, que en un futuro podrán resultar útiles, y que por desgracia debido a la mano del hombre no tienen asegurada su persistencia en el medio natural.

## 5. BIBLIOGRAFÍA.

- (1) Fernando de la Calle; “FÁRMACOS DE ORIGEN MARINO”. *Treballs de la SCB.Vol. 58 (2007) 141-155.*
- (2) JOSÉ CARLOS MENÉNDEZ; “Nuevos antitumorales de origen marino Anal”. *Real Acad. Nac. Farm., 2005, 71: 341-363.*
- (3) <http://www.guidechem.com>.
- (4) Wolfgang Ludwig<sup>1</sup>, Jean Euzéby<sup>2</sup>, and William B. Whitman<sup>3</sup>; Phylogenetic trees of the phylum *ACTINOBACTERIA*.
- (5) J.C. Escalona, R. Carrasco, J. A. Padrón; Introducción al diseño de Fármacos
- (6) Dendograma Silva The All-Species Living Tree (Release LTPs102\_SSU): 16S rRNA-based phylogenetic tree harboring all type strains of all species with validly published names up to February 2010.
- (7) Antibase 2011 database.
- (8) Markus Nett,<sup>a</sup> Haruo Ikeda,<sup>b</sup> and Bradley S. Moore<sup>\*c</sup> Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes<sup>†</sup>
- (9) <http://es.wikipedia.org>